

超高效液相色谱-串联三重四级杆质谱法快速测定尿液中4种除草剂

李启¹, 刘慧慧², 纪律¹, 徐峻卿¹

1. 丽水市疾病预防控制中心检验检测所, 浙江 丽水 323000; 2. 丽水市第二人民医院, 浙江 丽水 323000

摘要: **目的** 建立超高效液相色谱-串联三重四级杆质谱法同时快速测定尿液中二氯喹啉酸、乙草胺、丁草胺和异丙甲草胺。**方法** 人工尿液稀释10倍后配制混合标准溶液, 在色谱柱 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm) 上以0.1%甲酸和乙腈为流动相进行梯度洗脱, 采用电喷雾正离子源、多反应监测模式检测二氯喹啉酸、乙草胺、丁草胺和异丙甲草胺含量。**结果** 4种除草剂在色谱柱 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm) 上可有效分离。二氯喹啉酸、乙草胺和丁草胺在1~25 μg/L范围内, 异丙甲草胺在0.2~25 μg/L范围内线性关系良好, 相关系数均>0.999。二氯喹啉酸、乙草胺、丁草胺和异丙甲草胺的检出限分别为0.10、0.10和0.20和0.01 μg/L。在5 μg/L加标水平下尿液中二氯喹啉酸、乙草胺和丁草胺的回收率分别为107.42%、93.94%和90.27%, 相对标准偏差分别为4.82%、3.84%和6.76%; 在0.5 μg/L加标水平下, 异丙甲草胺的回收率为89.51%, 相对标准偏差为8.98%。**结论** 本方法优化了色谱和质谱条件, 可实现尿液中二氯喹啉酸、乙草胺、异丙甲草胺和丁草胺的同时快速测定。

关键词: 除草剂; 尿液; 超高效液相色谱-串联质谱法

中图分类号: R446.12

文献标识码: A

文章编号: 2096-5087 (2023) 02-0176-04

Rapid determination of four herbicides in urine with ultra-high performance liquid chromatography-triple quadrupole tandem mass spectrometry

LI Qi¹, LIU Huihui², JI Lü¹, XU Junqing¹

1. Department of Laboratory, Lishui Center for Disease Prevention and Control, Lishui, Zhejiang 323000, China;

2. The Second People's Hospital of Lishui, Lishui, Zhejiang 323000, China

Abstract: Objective To establish a ultra-high performance liquid chromatography-tandem triple quadrupole mass spectrometry method for rapid simultaneous determination of quinclorac, acetochlor, butachlor and metolachlor in urine. **Methods** Urine samples were diluted 10 times, prepared into the mixed standard solution, and subjected to gradient elution on the ACQUITY UPLC BEH C₁₈ column (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm) with 0.1% formic acid and acetonitrile as the mobile phase. The quinclorac, acetochlor, metolachlor and butachlor levels were determined using electrospray ionization-positive ultra-high performance liquid chromatography-tandem triple quadrupole mass spectrometry with the multiple reaction monitoring mode. **Results** Four herbicides were effectively separated on the ACQUITY UPLC BEH C₁₈ column (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm), and good linear relationships were observed for quinclorac, acetochlor and butachlor at 1 to 25 μg/L and for metolachlor at 0.2 to 25 μg/L, with all linear correlation coefficients of >0.999. The detection limits of quinclorac, acetochlor, butachlor and metolachlor were 0.10, 0.10, 0.20 and 0.01 μg/L, respectively. The recovery rates of quinclorac, acetochlor and butachlor were 107.42%, 93.94% and 90.27% from urine samples at a spiked level of 5 μg/L, with relative standard deviations of 4.82%, 3.84% and 6.76%, and the recovery rate of metolachlor was 89.51% at a spiked level of 0.5 μg/L, with a relative standard deviation of 8.98%. **Conclusion** The chromatography and mass spectrometry conditions are optimized in this ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spec-

DOI: 10.19485/j.cnki.issn2096-5087.2023.02.021

基金项目: 浙江省公共卫生应急检测关键技术重点实验室开放基金 (202003); 浙江省丽水市科技计划项目 (2021ZDYF17)

作者简介: 李启, 博士, 副主任技师, 主要从事理化检验工作

trometry, which is effective for rapid simultaneous determination of quinclorac, acetochlor, metolachlor and butachlor in urine samples.

Keywords: herbicide; urine; ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

二氯喹啉酸、乙草胺、丁草胺和异丙甲草胺是现阶段市场上销售的4种主要除草剂。二氯喹啉酸是一种喹啉羧酸类除草剂,目前主要的检测方法为气相色谱法^[1]和高效液相色谱法^[2-3]。为了克服二氯喹啉酸的热不稳定性,气相色谱法需衍生化,操作繁琐,耗时较长;而高效液相色谱法的灵敏度较低,应用前景不佳。乙草胺、丁草胺和异丙甲草胺均为酰胺类除草剂,检测技术主要有气相色谱法^[4]、高效液相色谱法^[5-6]、光谱法^[7]和色谱质谱联用法^[8-9]。3种除草剂极性弱,挥发性弱,气相色谱法和光谱法检测的灵敏度较低,理论上适用高效液相色谱法,但其多组分同时检测能力不足;色谱质谱联用法可同时实现多组分分离,具有更强的定性和定量能力。本研究建立一种同时检测尿液中二氯喹啉酸、乙草胺、丁草胺和异丙甲草胺的超高效液相色谱-串联三重四级杆质谱(ultra performance liquid chromatography-tandem triple quadrupole mass spectrometry, UPLC-QqQ-MS/MS)快速检测方法。

1 材料与amp;方法

1.1 仪器与试剂 Xevo TQ-S 超高效液相色谱-串联三重四级杆质谱仪(美国 Waters 公司); 3-30K 低温高速离心机(美国 Sigma-Aldrich 公司); D11911 超纯水器(美国 Thermo Fisher 公司)。二氯喹啉酸、乙草胺、异丙甲草胺、丁草胺(100 μg/mL, 北京坛墨科技股份有限公司); 人工尿液(东莞市创峰自动化科技有限公司); 乙腈、甲醇(HPLC 级, 德国 Merck 公司); 甲酸(LC-MS 级, 西班牙 Scharlau 公司); 氨水(优级纯, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 标准溶液的配制 标准储备液的配制: 用甲醇稀释二氯喹啉酸、乙草胺、异丙甲草胺和丁草胺, 配制成 1 000 μg/L 的标准储备液, 4℃保存。混合标准储备液的配制: 用甲醇稀释定容乙草胺和异丙甲草胺标准储备液, 配制成 100 μg/L 乙草胺、10 μg/L 异丙甲草胺的混合标准储备液。

1.2.2 质谱和色谱条件的优化 通过单因素优化法比较 5 μg/L 二氯喹啉酸、5 μg/L 乙草胺、20 μg/L 丁草胺和 0.5 μg/L 异丙甲草胺混合标准溶液的响应值, 优化色谱、质谱条件。分别使用 ACQUITY UPLC

BEH C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm) 和 HSS T3 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm) 色谱柱分离 4 种除草剂混合标准溶液, 比较分离效果以选择适合的色谱柱。以乙腈为有机相, 比较氨水、甲酸溶液为水相时 4 种除草剂的色谱分离情况, 并优化浓度。采用三重四级杆质谱检测器, 在电喷雾正离子源(electrospray ionization, ESI⁺)模式下, 将毛细管电压分别设定为 0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4 V, 考察 4 种除草剂的响应值, 优化毛细管电压。

优化后, 色谱柱选用 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm), 柱温 35℃。流动相 A 为 0.1% 甲酸水溶液, 流动相 B 为乙腈。梯度洗脱条件: 0~2.0 min, 95% A; 2.0~3.1 min, 95%~5% A; 3.1~3.2 min, 5%~40% A; 3.2~3.6 min, 40%~95% A; 3.6~5.0 min, 95% A。流速 0.3 mL/min; 进样体积 10 μL; 样品室温度 4℃。质谱条件: 多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)模式, ESI⁺; 离子源温度 150℃; 毛细管电压 3.0 kV; 脱溶剂温度 600℃; 脱溶剂气流量 950 L/h。

表 1 4 种除草剂的 MRM 质谱条件

Table 1 Mass spectrometry conditions for determination of four herbicides with the multiple reaction monitoring mode

除草剂	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	锥孔电 压/V	碰撞能 量/eV
二氯喹啉酸	241.9	223.9	16	15
	241.9	160.9 [*]	16	35
乙草胺	270.2	224.0	14	9
	270.2	133.1 [*]	14	31
异丙甲草胺	284.0	252.1 [*]	15	14
	284.0	176.1	15	25
丁草胺	312.0	238.1 [*]	15	10
	312.0	162.2	15	20

注: *为定量离子对。

1.2.3 尿液前处理 吸取 1 mL 人工尿液, 用水稀释 10 倍, 旋涡混匀 1 min, 41 400×g, 4℃离心 3 min, 吸取上清液于冻存管中, 0.22 μm 微孔滤膜过滤后待用。

1.2.4 方法的灵敏度、回收率和精密度检验 采用人工尿液逐级稀释标准储备液和混合标准储备液, 配制 5 种梯度浓度的除草剂尿液混合标准溶液, 二氯喹啉

酸、乙草胺、丁草胺浓度分别为 1、5、10、15、20、25 $\mu\text{g/L}$ ，异丙甲草胺浓度分别为 0.2、0.5、1、2、5、10、25 $\mu\text{g/L}$ 。按优化后的色谱、质谱条件检测，以除草剂浓度为横坐标，定量离子对的峰面积为纵坐标，绘制混合标准溶液的工作曲线，得到线性范围及相关系数。基质溶液连续进样计算噪声，然后进样分析，信噪比为 3 时的样品浓度即为检出限。配制 5 $\mu\text{g/L}$ 二氯喹啉酸、5 $\mu\text{g/L}$ 乙草胺、5 $\mu\text{g/L}$ 丁草胺和 0.5 $\mu\text{g/L}$ 异丙甲草胺的人工尿液基质标准溶液，平行重复 7 次检验方法回收率和精密度。

1.2.5 基质效应 采用 0.1% 甲酸水溶液逐级稀释标准储备液和混合标准储备液，配制 5 种浓度梯度的除草剂空白混合标准溶液，二氯喹啉酸、乙草胺、丁草胺浓度分别为 1、5、10、20、50、75、100 $\mu\text{g/L}$ ，

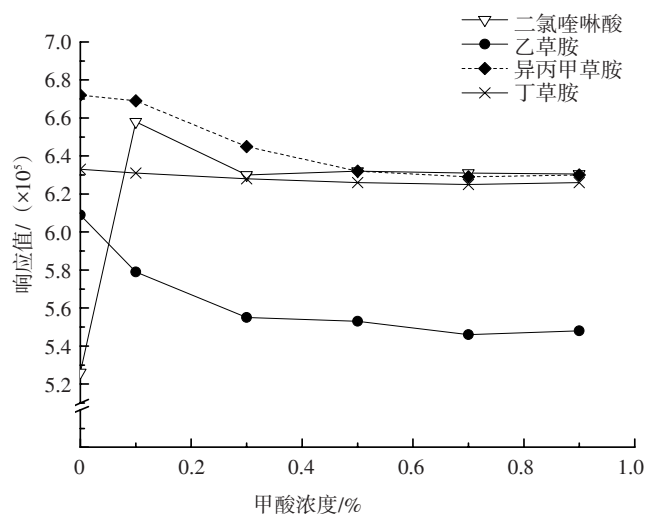


图 1 不同甲酸浓度下 4 种除草剂响应值变化

Figure 1 Effect of formic acid concentrations on response values of four herbicides

2.2 线性范围和检出限 人工尿液中 4 种除草剂线性关系良好，线性相关系数均 >0.999 。二氯喹啉酸、乙草胺、丁草胺和异丙甲草胺的检出限分别为 0.10、0.10、0.20 和 0.01 $\mu\text{g/L}$ 。见表 2。

2.3 加标回收率和精密度 人工尿液中二氯喹啉酸、乙草胺、丁草胺和异丙甲草胺的加标回收率分别为 107.42%、93.94%、90.27% 和 89.51%，相对标准偏差分别为 4.82%、3.84%、6.76% 和 8.98%。

2.4 基质效应分析结果 初始流动相中 4 种除草剂的 UPLC-QqQ-MS/MS 谱图与尿液中的迁移时间和峰形一致。初始流动相中异丙甲草胺、二氯喹啉酸、丁草胺和乙草胺的检出限分别为 0.01、0.05、0.10 和 0.10 $\mu\text{g/L}$ ，见表 3。尿液基质和初始流动相中乙草胺

和异丙甲草胺检出限相同，二氯喹啉酸和丁草胺检出限在同一数量级，说明基质效应对 4 种除草剂检测的影响较小。

2 结果

2.1 色谱、质谱条件优化结果 采用色谱柱 ACQUITY UPLC BEH C_{18} (100 mm \times 2.1 mm, 1.7 μm) 时，丁草胺、二氯喹啉酸信噪比较高且峰形良好。甲酸水溶液为水相、浓度为 0.1% 时 4 种除草剂响应值较高，且均能实现基线分离，见图 1。优化质谱毛细管电压，在毛细管电压为 3.0 kV 时，4 种除草剂响应值均较高，见图 2。上述最优条件下检测 4 种除草剂混标溶液，UPLC-QqQ-MS/MS 谱图峰形良好，见图 3。

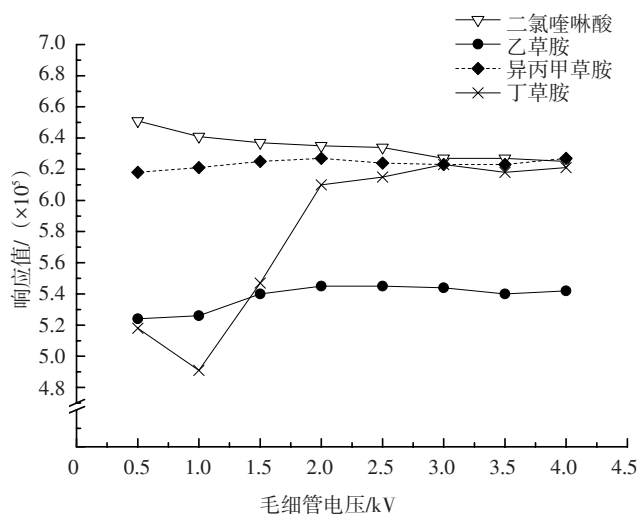


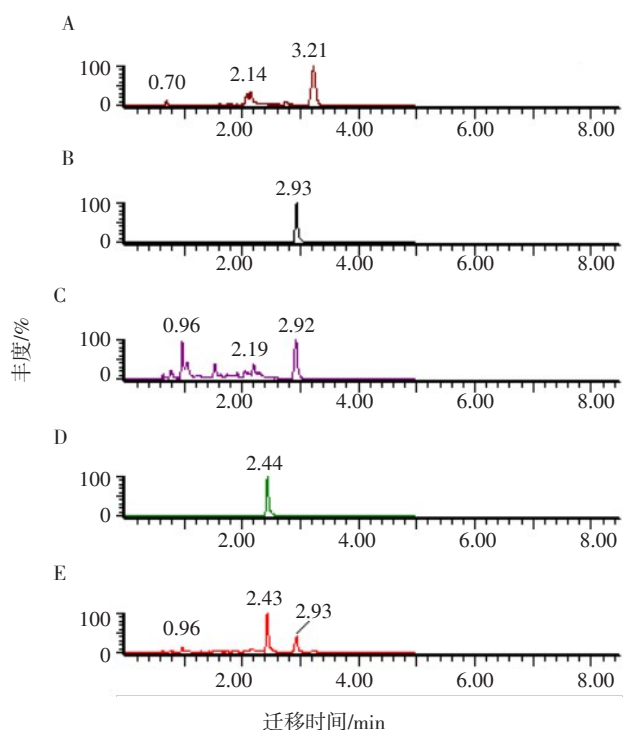
图 2 不同毛细管电压下 4 种除草剂响应值变化

Figure 2 Effect of capillary voltages on response values of four herbicides

和异丙甲草胺检出限相同，二氯喹啉酸和丁草胺检出限在同一数量级，说明基质效应对 4 种除草剂检测的影响较小。

3 讨论

随着用量的增加，除草剂对人畜健康和生态环境的危害和影响也越来越突出，误食中毒事件时有发生，中毒患者如不及时急救，病情会急剧恶化危及生命。快速分析除草剂中毒者的尿液样本、第一时间确定除草剂种类可为中毒者的救治争取时间，对于及时救治中毒者、降低死亡率至关重要^[10-11]，因此检测方法的灵敏度和分析速度为主要评估指标。本研究选择仪器允许的最大进样体积 10 μL 检验样品，



注: A, 丁草胺; B, 异丙甲草胺; C, 乙草胺; D, 二氯喹啉酸; E, 丁草胺、异丙甲草胺、乙草胺和二氯喹啉酸。

图3 尿液中4种除草剂的UPLC-QqQ-MS/MS谱图
Figure 3 UPLC-QqQ-MS/MS spectrogram of four herbicides in urine samples

4种除草剂在人工尿液基质成分与初始流动相基质中的检出限相当,在得到较高的信号强度的同时基质效应不明显,且该方法除草剂的检出限低,灵敏度较高;样本前处理简单,稀释后可直接进行检测,且单次分析时间仅4 min,省时省力,适用于除草剂中毒的快速检测。

参考文献

[1] GROSSMANN K, KWIATKOWSKI J. The mechanism of quinclorac selectivity in grasses [J]. Pestic Biochem Physiol, 1995 (51): 150-161.
[2] COLAZZO M, PARJA L, CESIO M V, et al. Multi-residue method for trace pesticide analysis in soils by LC-QQQ-MS/MS and its application to real samples [J]. Int J Environ Anal Chem, 2018, 98 (14): 1292-1308.
[3] 纪律, 李启, 李伟营, 等. 超高效液相色谱-三重四级杆质谱法测定水中二氯喹啉酸残留 [J]. 预防医学, 2020, 32 (12): 1283-1286.

表2 尿液中4种除草剂的工作曲线定量分析结果

Table 2 Quantitative analysis of working curves of four herbicides in urine samples

除草剂	线性范围/ ($\mu\text{g/L}$)	回归方程	r值	检出限/ ($\mu\text{g/L}$)
二氯喹啉酸	1~25	$y=9\ 152.93x-95.26$	0.999 7	0.10
乙草胺	1~25	$y=6\ 067.58x-280.49$	0.999 4	0.10
异丙甲草胺	0.2~25	$y=9\ 225.51x-13\ 459.70$	0.999 2	0.01
丁草胺	1~25	$y=4\ 566.85x-5\ 262.32$	0.998 2	0.20

表3 初始流动相中4种除草剂的工作曲线定量分析结果

Table 3 Quantitative analysis of working curves of four herbicides in the initial mobile phase

除草剂	线性范围/ ($\mu\text{g/L}$)	回归方程	r值	检出限/ ($\mu\text{g/L}$)
二氯喹啉酸	1~100	$y=17\ 027.40x-19\ 468.40$	0.999 9	0.05
乙草胺	1~100	$y=2\ 692.01x+2\ 283.84$	0.999 4	0.10
异丙甲草胺	0.1~10	$y=149\ 189.00x+16\ 898.60$	0.999 6	0.01
丁草胺	1~100	$y=7\ 982.09x+4\ 574.80$	0.999 3	0.10

[4] 常青云, 周欣, 高书涛, 等. 悬浮固液相微萃取-气相色谱联用测定水样中酰胺类除草剂残留 [J]. 分析化学, 2012, 40 (4): 523-528.
[5] 钱训, 谭小会. 液相色谱法同时测定除草剂中乙草胺、异噁草酮和2,4-滴丁酯的含量 [J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 17 (9): 4546-4549.
[6] 李建中, 储晓刚, 蔡会霞, 等. 高效液相色谱法同时测定大豆中12种酰胺类除草剂的残留量 [J]. 色谱, 2006, 24 (6): 585-588.
[7] 王晓燕, 季仁东, 陈仁文. 异丙甲草胺农药残留吸收光谱检测方法研究 [J]. 光谱学与光谱分析, 2019, 39 (1): 180-184.
[8] 李菊颖, 郭欣妍, 何健, 等. 玉米粉中吡虫啉、三唑酮、乙草胺与异丙甲草胺的QuEChERS/高效液相色谱-串联质谱快速检测 [J]. 分析测试学报, 2017, 36 (6): 783-787.
[9] 梅文泉, 黎其万, 方海仙, 等. QuEChERS-气相色谱-质谱法测定土壤中6种酰胺类除草剂残留 [J]. 色谱, 2017, 35 (12): 1317-1321.
[10] 李启, 纪律, 徐峻卿, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法快速测定血浆中乙草胺和异丙甲草胺 [J]. 中国卫生检验杂志, 2022, 32 (7): 798-801.
[11] 马力, 金永堂. 湖州市农药中毒病例特征分析 [J]. 预防医学, 2020, 32 (3): 301-303, 306.

收稿日期: 2022-09-08 修回日期: 2022-01-17 本文编辑: 吉兆洋